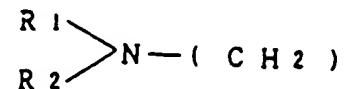


JP 404100501
APR 1992(54) CYCLODEXTRIN DERIVATIVE AND COLOR DEVELOPMENT BY USING
SAME

(11) 4-100801 (A) (43) 2.4.1992 (19) JP
(21) Appl. No. 2-218145 (22) 21.8.1990
(71) IATRON LAB INC (72) TATSUHIKO YAGI(4)
(51) Int. Cl. C08B37/16, G01N31/22

PURPOSE: To provide a cyclodextrin derivative effective in enhancing the color development of a nitrophenol derivative in the visible region and useful for the measurement of enzymatic activity, etc., by covalently bonding a plurality of specified basic functional groups to cyclodextrin.

CONSTITUTION: A cyclodextrin derivative having at least three covalently bonded basic functional groups of a structure of the formula (wherein R₁ and R₂ are each 1-3C lower alkyl or H; and n is 1-3) is produced by, for example, reacting α , β or γ -cyclodextrin with an excess of a dialkylaminoalkyl chloride. Because this derivative enhances the color development of a nitrophenol derivative in the visible region, it can improve the measurement accuracy when it is applied to the measurement of the activity of various enzymes by using synthetic substrates to which a nitrophenol derivative as a color developer is bonded.



⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平4-100801

⑬ Int.Cl.³

C 08 B 37/16
G 01 N 31/22

識別記号

122

庁内整理番号

7624-4C
9015-2G

⑭ 公開 平成4年(1992)4月2日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

⑮ 発明の名称 シクロデキストリン誘導体及びそれを用いた発色方法

⑯ 特願 平2-218145

⑰ 出願 平2(1990)8月21日

⑱ 発明者 八木 達彦 静岡県静岡市北1664番地の33

⑲ 発明者 久田 隆基 静岡県静岡市下島615番地の72

⑳ 発明者 柴田 秀人 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン
内

㉑ 発明者 嶋本 三利 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン
内

㉒ 発明者 吉村 智子 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン
内

㉓ 出願人 株式会社ヤトロン 東京都千代田区東神田1丁目11番4号

明細書

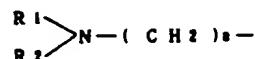
1. 発明の名称

シクロデキストリン誘導体及びそれを用いた発

色方法

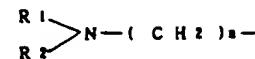
2. 特許請求の範囲

(1) 下記式の構造を有する塩基性官能基を少なくとも3分子共有結合させたシクロデキストリン誘導体。



(式中R₁、R₂はそれぞれ炭素数1~3個の低級アルキル基もしくは水素であって、nは1~3の整数を表す。)

(2) 下記式の構造を有する塩基性官能基を少なくとも3分子共有結合させたシクロデキストリン誘導体を用いて、ニトロフェノール誘導体を包接するすることを特徴とする発色方法。



(式中R₁、R₂はそれぞれ炭素数1~3個の低級アルキル基もしくは水素であって、nは1~3の整数を表す。)

3. 発明の詳細な説明

【原理上の利用分野】

本発明は塩基性官能基で標識されたシクロデキストリンに関するもので、合成基質を用いた測定法等に応用され、臨床化学検査等の分野において効果的に用いられる。更に本発明はニトロフェノール類を中性ないし酸性条件下で発色させるための試薬及び方法に関するものである。

【従来の技術及びその問題点】

ニトロフェノール類の1種である4-ニトロフェノール(パラニトロフェノールともいう)は4-ニトロフェノール基をもつ各種合成基質が特定の酵素作用により分解されるときに生成する物質で、この物質の増加を経時的に定量することにより当該酵素の活性を容易に測定することができる。例えば、ファスファターゼの活性を測定するためには4-ニトロフェノールリン酸を基質として

避離して生じる4-ニトロフェノールを定量する。フェスティジエステラーゼの活性測定にはビス(4-ニトロフェニル)リン酸を基質として同様に測定する。 β -N-アセチルヘキソナミニダーゼと β -N-アセチルグルコサミニダーゼの活性測定では、合成基質として4-ニトロフェニルN-アセチル- β -D-グルコサミニドが利用される。その他、各種のグリコシダーゼ(グリコシド結合の加水分解を触媒する酵素)、グルクロニダーゼ、スルファターゼ、ホスホリバーゼC、トリブシンやキモトリブシンなどのセリンプロテアーゼ、D-グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼなどに対し、4-ニトロフェニル基をもつ合成基質が開発され、臨床検査をはじめとするさまざまな分野で実用に供されている。

以上の例で示した各種酵素の活性測定が可能となる原理は、例えば4-ニトロフェニル基をもつ合成基質の場合は、その合成基質と避離して生じる4-ニトロフェノールの間で蛍光スペクトルに差があるという事実に基盤をもっている。すなわち

間後に、アルカリを添加して反応を停止させると同時に生成した4-ニトロフェノールを発色させ、その400nm付近の蛍光度を測定するという方法が多く採用されている。すなわち、現行測定法では酵素活性測定法としてより正確で簡便な形式といわれる理学的なレートアッセイが困難なだけでなく、アルカリ添加という余分な操作を必要とする。中性ないし弱酸性の領域に及ぶpHをもつ酵素には、例えば酸性ホスファターゼ、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -グルクロニダーゼなど臨床化学的に重要な酵素が含まれている。これら臨床化学的重要な酵素が含まれている。これら臨床化学的重要な酵素が含まれている。これら臨床化学的重要な酵素が含まれている。

従って、4-ニトロフェノール及びその他のニトロフェノール類の中性ないし弱酸性のpH領域での効果的な発色促進作用を有する試薬の開発は、臨床化学検査分野における実用面に重要な課題と

なっている。4-ニトロフェニル基をもつ合成基質は広いpH領域において紫外部(波長300~320nm)に強い吸光ピークをもち可視部(波長400nm以上)にはほとんど吸光を示さないが、4-ニトロフェノールはアルカリ性pH領域において電離し、400nm付近を中心とする強い吸光ピークをもつ4-ニトロフェノレート・アニオンを生じる。したがって、測定しようとする酵素の活性をアルカリ性pH領域で測定できれば、酵素反応の進行とともに可視域の発色を400nmの吸光度増加として連続モニターでき、正確なレートアッセイが可能となる。しかし、測定しようとする酵素の最適pHが中性ないし弱酸性の領域にあれば、4-ニトロフェノールはその解離が不完全か、ほとんど解離せず、吸光スペクトルは4-ニトロフェニル基をもつ合成基質の吸光スペクトルとほとんどオーバーラップしてしまう、発色が微弱で、反応を経時的に連続モニターすることが著しく不都合となる。そこで、現行の測定法では、酵素反応をスタートさせてから一定時

なっている。

[問題点を解決するための手段]

そこで、以前本発明者らは、堿基性官能基を共有結合させた新規シクロデキストリン誘導体を用いて、アグリコンである各種ニトロフェノール誘導体を包摂し、中性ないし弱酸性条件下における発色効果を向上させる技術を開示した。(特開昭63-243101号公報)

該技術は実用的には充分な効果を得られるものであるが、本発明者らは、それに満足することなく更に検討を加えた。

該技術はヨー又はヨーシクロデキストリンに、例えば、ジエチルアミノエチル基、ジメチルアミノメチル基、ジメチルアミノプロピル基、アミノエチル基等を結合させたものである。明細書にも記述している通り、その導入個数はシクロデキストリン1分子に対し、1個ないし2個が共有結合されていることが確認でき、例えばジエチルアミノエチル基導入シクロデキストリン(以下DE-CDともいう)を含む溶液中、4-ニトロフェノ

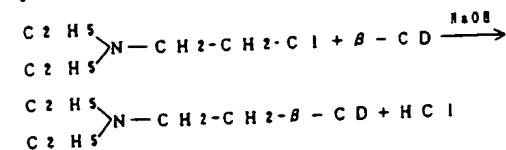
特開平4-100801(2)

1つ合成基質は広い
2300~320 nm
可視部(波長400
を示さないが、4-
モノH領域において
いとする強い蛍光ビ
ノート。アニオンを
ようとする酵素の活
足できれば、酵素反
色を400 nmの
一でき、正確なレー
かし、測定しようと
いし酵素には酸性
フェノールはその解
せず、蛍光スペクト
もつ合成基質の蛍光
ーラップしてしま
的に連続モニターす
。そこで、現行の測
トさせてから一定時

ールのpH 5.0, 400 nmにおける蛍光度は
、4-ニトロフェノールの紫外吸収光度の30%
以上に達し、必要充分な感度を得たのである。

上記特許に記されているように塩基性官能基を
共有結合させたシクロデキストリン誘導体は、未
酵素のシクロデキストリンに比し、多くの長所を
持っていることが明白になった。しかしながら、
これらのシクロデキストリン誘導体をもってしても
、測定pHが更に酸性にすれば、又はpH
の酸性側から中性側にシフトしているニトロフェ
ノール誘導体に対しては、充分にニトロフェノ
ール酸を溶解させることが出来ず、可視部におけ
る飛躍的な蛍光度上昇が望まれるところであった
。そこで、本発明者は該技術をおし進め、シク
ロデキストリン1分子に対し平均3分子以上の塩
基性官能基を結合させる方法を見い出し、これら
3分子以上の塩基性官能基が共有結合したシクロ
デキストリンの共存が従来のシクロデキストリン
又はしないし2分子の塩基性官能基結合シクロデ
キストリンの共存に比べ、中性ないしは酸性領域

において4-ニトロフェノールを始めとする各種
ニトロフェノール誘導体のpKaを極めて大きく
酸性側にずらし、その結果として更に極大吸収ス
ペクトルを長波長側にシフトさせ相乗的に顕著な
発色効果をもたらすことを見い出し本発明を完成
した。β-シクロデキストリン1分子に平均3
分子以上の塩基性官能基を結合させるための合成
法に関するては、本発明の為に塩基性官能基として
まずジエチルアミノエチル基を選び、以下の原理
によりそのシクロデキストリン結合体を完成した
。



本反応において1分子のβ-シクロデキストリン
に導入されるジエチルアミノエチル基の分子数
はシクロデキストリンとジエチルアミノエチル基
のモル比、反応温度、反応時間、反応pHにより
大きく左右されることがわかった。すなわち、1

段】

1、塩基性官能基を共
用ストリン誘導体を用
4-ニトロフェノール誘
酸性条件下における
を明示した。(特開昭

この効果を得られるもの
それに満足することな

シクロデキストリンに、
トル基、ジメチルアミ
ノプロピル基、アミノ
のである。酵素にも
入基質はシクロデキス
ないし2個が共有結合
、例えばジエチルア
ミノエチル基(以下DE-
中、4-ニトロフェノ

分子のβ-シクロデキストリンに平均3分子以上
のジエチルアミノエチル基を結合させる為には、
モル比でβ-シクロデキストリンに対しジエチル
アミノエチルクロリドが望ましくは5以上、反応
温度は20~70°C、反応時間として30分~1
0時間、反応pHはアルカリ性に保つことが必要
で、特にpH 10以上が望ましい反応条件である
ことがわかった。

同様にして、β-、γ-シクロデキストリンの
ポリDEAE結合体が得られる。また、ジエチル
アミノエチル基以外にジメチルアミノエチル、ジ
メチルアミノプロピル、アミノエチル基等の結合
体も得ることができる。このように3分子以上の
塩基性官能基で導入されたシクロデキストリン、
例えばポリジエチルアミノエチル化ローシクロデ
キストリン(以下ポリDE-αCDと略す。)、
ポリジエチルアミノエチル化β-シクロデキスト
リン(以下ポリDE-βCDと略す。)およびポ
リジエチルアミノエチル化γ-シクロデキストリ
ン(以下ポリDE-γCDと略す。)は紫外にも

、通常のシクロデキストリンに比べてはるかに水に
よく溶け実用に供し易いものであった。現在、特
に安価で一般に用いられているβ-シクロデキス
トリルは比較的に水に難溶性でこの性質が臨床化
学検査などにおける実用上の範囲を決めているもの
である。すなわち、難溶性の目的物質をシクロ
デキストリンの包接により溶解せしめる時シクロ
デキストリン自身の溶解性によりその溶解度が限
定されてしまうのである。具体的には特定基質の
活性を測定するためによく使用される合成基質の
溶解の場合などである。加水分解酵素の多くの場
合は難溶性のニトロフェノール誘導体が発色剤と
して酵素反応の経過観察のために結合されている
。例えば、前述のN-アセチル-β-D-グルコ
サミニダーゼ測定のための合成基質である、4-
ニトロフェニル(あるいは2-クロロ-4-ニト
ロフェニル)-N-アセチル-β-D-グルコサ
ミニドの場合、β-シクロデキストリンの助けで
必要量の溶解が試みられるが、シクロデキストリ
ン自身の溶解性の悪さのためその目的を充分に果

たし得ない。それに比し、本発明によるポリDE-CD類はたやすく水に溶解させることができ、その包接能により上記基質等を充分に必要量溶かし得るのでこの面においても本発明に実用的価値を付加するものである。

更に本発明の本質である中性ないしは弱酸性条件下でのニトロフェノール誘導体に対する発色効果を種々の誘導体を用いて調べた。4-ニトロフェノール、2-クロロ-4-ニトロフェノール、5-ニトロナリチル酸、5-ニトロナリチル酸メチル、2、4-ジニトロフェノール、3、4-ジニトロフェノール等についてである。驚くべきことにこれらの中で最も中性ないしは特に弱酸性下で電離が致密な、すなわちpH 5.0付近においては、400nm付近での電離性の可視部発色ピークが認められない4-ニトロフェノールさえポリDE-CD類の1%以下の通常濃度の存在下でその400nm付近に大きな新しい電離性の発色ピークを出現させ、ポリDE-CD類の作用とその効果が顕著であることが示された。通常のシ

クロデキストリンではこれ程の効果は認められない。また、DEの導入がないし2分子の場合と比較しても効果は絶大なるものである。またポリDE-CD類は水への溶解性が更に良いため使用量を増やして効率的な増強ができる。また他のニトロフェノールについても1%以下の通常濃度でDE- α 、DE- β と比較して顕著な可視部発色効果が示された。特に2-クロロ-4-ニトロフェノールは中性ないし酸性下で4-ニトロフェノールに比べ、比較的発色がなされ易いものとして、最近それを結合させた特定酵素のための合成基質が供されているが、例えばpH 5.0以下で酵素反応を行う前記のN-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ等については、酵素反応の結果そのpHで生成する2-クロロ-4-ニトロフェノールの400nm付近における電離発色は、未酵素のCDの場合は全く不充分で、またその基質としての溶解度を充分に維持できないため、その生成量を連続モニターできるほどの濃度と精度をもたない。またDE-CDを用いても改善の余地は

残されている。しかし、ここへのポリDE-CD類の添加は生成する2-クロロ-4-ニトロフェノールの吸収スペクトルを完全電離に近いながらに出現せしめ発色させるので、理想的な状態での当酵素の連続モニター測定が行える。

前記の通りポリDE- α CD、ポリDE- β CD及びポリDE- γ CDは充分水に溶け易く、当合成基質の必要量を反応液に溶解できることと合わせ実用的に新しい効果を有する。

以上の効果は、同様に、中性付近で反応を行う α -アミラーゼのための合成基質である、4-ニトロフェニル-マルトヘプタオシド、あるいは2-クロロ-4-ニトロフェニル-マルトペンタオシド等を用いて生成するニトロフェニル誘導体を400nm付近で連続モニターする α -アミラーゼの測定の場合、あるいは、よりpHの低い領域で酵素反応を行わせる酸性ホスファターゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、エステラーゼ、アリルスルファターゼ等の測定においても、通常のシクロデキストリンに比し、はるかに効果的に

使用される。

以上ポリDE- α CD、ポリDE- β CD及びポリDE- γ CDについての本発明の効果を述べたが、他の堿基性官能基を修飾したシクロデキストリン及び他の酵素反応のためのニトロフェノール誘導体を結合した他の合成基質を使用する場合においても、本発明の本質は同様である。更にニトロフェノール誘導体の1つである3、4-ジニトロフェニル基を用いた合成基質による種々酵素の測定法においては、本発明のポリDE-CDとの組合せにより、両者の利点が相まって従来にならない高精度な酵素活性測定を供することができる。

以下、実施例により本発明の作用、効果をさらに詳しく説明する。

実施例-1 ポリDE-CD類の合成方法

1. ポリDE- α CDの合成方法

ヨーシクロデキストリン2.4gを4mlの蒸留水に溶解させ、搅拌しながら水酸化ナトリウム1.5gを含む4mlの水溶液を滴下する。次にジエチルアミノエチルクロリド塩酸塩1.4gを

さじ2
をさせ
50c
を充填
により
Dを得
チル基
定、元
判明し
の基質
クム1
にジエ
を含む
、反応が
化ナト
。そのま
のカラム
し、L
リDE-
いし4瓶

ロロ-4
フェノー
ナリチル
れた。

シクロデ
基添加
DE-
ポリD
DE-
ポリD
DE-
ポリD

実施例-
実施例
基の結合
-BCD
コハク酸
中の3、
した結果：

は認められない分子の場合となる。またポリ良いため使用。また他のニの通常濃度でな可視部発色4-ニトロフニトロフェノーいものとしてための合成基0以下で酵B-D-グル反応の結果そニトロフェノー1発色は、未だその基質とため、その生濃度と精度をも改善の余地は

さむ2mlの水溶液を滴下し、30℃で3時間反応させる。その後反応液を直径1.5cm、高さ5.0cmのクロマト管にセファデックスG-25を充填したものを用いてカラムクロマトグラフィにより分子量別に分別し、1.5gのDE-αCDを得た。このDE-αCDはジエチルアミノエチル基が1ないし2個結合していることが中和滴定、元素分析、プロトン核磁気共鳴の分析により判明した。次に、このDE-αCD 2gを4mlの蒸留水に懸濁させ、攪拌しながら水酸化ナトリウム1.2gを含む4mlの水溶液を加える。更にジエチルアミノエチルクロリド塩酸塩2.0gを含む2mlの水溶液を滴下し、50℃で5時間、反応液のpHが11を下回らないように水酸化ナトリウム溶液を随時添加しながら反応させる。その後反応液を前述のセファデックスG-25のカラムクロマトグラフィにより分子量別に分別し、1.2gのポリDE-αCDを得た。このポリDE-αCDはジエチルアミノエチル基が3ないし4個結合していることが中和滴定、元素分析

E-βCD及びの効果を述べシクロデキスニトロフェノーを使用する場合である。更にニ3.4-ジニによる種々酵素リDE-CDとまって将来になことができる。用、効果をさら

合成方法

gを4mlの蒸留水に加え、水酸化ナトリウムを4gを

ロ-4-ニトロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、5-ニトロサリチル酸、5-ニトロサリチル酸メチルについて発光度の増加が認められた。

表1

シクロデキストリンの種類	発光度
無添加	0.080
DE-αCD	0.281
ポリDE-αCD	0.477
DE-βCD	0.213
ポリDE-βCD	0.409
DE-γCD	0.163
ポリDE-γCD	0.386

実験例-3 DE等入数によるpKへの効果

実験例1の2で合成したジエチルアミノエチル基の結合個数の異なるDE-βCD及びポリDE-βCDのそれぞれの濃度が1%となる25mMコハク酸緩衝液を調製した。そしてこの各緩衝液中の3,4-ジニトロフェノールのpKを測定した結果を表2に示す。

(以下余白)

の分析により判明した。同様の操作を繰り返すことにより、ジエチルアミノエチル基の導入個数を増やすことができる。

2. ポリDE-βCDの合成方法

前述の合成法1において、ヨーシクロデキストリンに加え、ヨーシクロデキストリンを使用し同様の操作により、ポリDE-βCDを合成した。

3. ポリDE-γCDの合成方法

前述の合成法1において、ヨーシクロデキストリンに加え、ヨーシクロデキストリンを使用し同様の操作により、ポリDE-γCDを合成した。

実験例-2 各ポリDE-CD類の4-ニトロフェノールに対する可視部発色効果

pH 5.0の20mM酢酸緩衝液中における4-ニトロフェノールの400nmにおける吸光度を、シクロデキストリン無添加、1%DE-CD添加、実験例1で合成した各ポリDE-CDを1%添加のそれぞれを比較検討した結果を表1に示す。

同様にして4-ニトロフェノール以外の2-ク

表2

No.	DE等入数	pK
对照	無添加	5.4
1	1.8	4.7
2	3.0	4.4
3	3.8	4.2
4	4.5	4.1

(DE等入数は、中和滴定法による計算値)

実験例-4 酵素反応への応用

以下の操作により、N-アセチル-B-D-グルコサミニダーゼ活性を測定した。

(1) 試薬の調製

- 3,4-ジニトロフェニル-N-アセチル-B-D-グルコサミニド: 1.2mM
- コハク酸緩衝液(pH 5.0): 25mM
- 各ポリDE-βCD: 1%

(2) 操作法及び結果

N-アセチル-B-D-グルコサミニダーゼ液(シグマ社製ヒト胎盤の酵素で、活性値を50U/mlに調整)100μlに、37℃で5分間加温した試薬3mlを加え反応させ、試薬プランクを対照に5分間当たりの400nmにおける吸光度

変化を測定した。その結果を表3に示す。

表3

No.	D E 等入数	蛍光強度変化 ($\times 10^{-3}$)
对照	無添加	50
1	1.8	107
2	3.0	136
3	3.8	147
4	4.5	151

【発明の効果】

以上から明らかな如く、本発明によれば導電性高分子を少なくとも3分子以上結合したシクロデキストリン誘導体は、ニトロフェノール誘導体の可視部における発色を著しく増強する効果を有し、ニトロフェノール誘導体を結合した合成基質を用いる各種の酵素活性測定方法に応用するとき、特にレート分析の精度を格段に向上させるという効果を有する。

特許出願人 株式会社ヤトロン